

氨氧化古菌——环境微生物生态学 研究的一个前沿热点^{*}

胡安谊 焦念志^{**}

厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005

摘要 新近在环境基因组学研究上的突破和常温型泉古菌纯培养株系的获得揭示出氨氧化古菌(AOA)是一个不同寻常的功能类群. 通过对氨氧化过程的关键酶之一氨单加氧酶(AMO) 亚基的编码基因(*amoA*)的系统发育分析发现, AOA 是一个独立于氨氧化细菌(AOB)进化枝之外的进化类群. 目前已确认, AOA 是自然界中最丰富的氨氧化生物, 其 *amoA* 基因的拷贝数最高可超过 AOB *amoA* 基因拷贝数 3 个数量级. 在自然生态系统, 尤其是海洋生态系统中具有十分重要的生态地位. 据热力学估算, 海洋 AOA 每年生成的 NO_2^- 与全球海洋新生产力(即海洋对大气碳封存)所需的 N 量相当; 由 AOA 氧化海洋中的 NH_3 获能所固定的 CO_2 的总量远远超过了埋藏于全球海洋沉积物中的碳量. AOA 已成为今后环境微生物生态学的研究热点之一.

关键词 氨氧化古菌 氨氧化细菌 氨单加氧酶 氨单加氧基因 环境微生物生态学

20 世纪 70 年代末期, Woese 等学者根据核糖体小亚基的核酸序列(small subunit rRNA)的系统发育关系, 重新将所有生物划分为三大生物域, 包括真核生物、真细菌和古菌^[1]. 其中, 古菌(Archaea)又可分为广古菌(*Euryarchaeota*)和泉古菌(*Crenarchaeota*)两大类, 除此之外, 还存在一类古老的嗜热古菌—初生古菌(*Korarchaeota*)^[2]. 早期研究发现, 古菌多分布于海底热液、陆地热泉、火山口以及盐碱湖等极端环境^[3]. 直到 1992 年, DeLong^[4]和 Fuhrman 等^[5]才首次发现了海洋浮游古菌, 其在海洋生态系统的分布和生态作用才逐渐被人们所关注^[6]. 随后, 生态学家又陆续在土壤、淡水湖泊、沉积物以及动物肠道等生境中发现了古菌^[7], 这说明古菌在常温生态系统(相对于热泉等高温极端环境)中的作用同样不可忽视. 尽管分子生物学技术在环境微生物学领域的应用极大推动了常

温型古菌(mesophilic archaea)的研究, 但其生理代谢与生态功能方面的研究却一直进展缓慢. 最近, 环境基因组学^[8]和常温型古菌分离培养^[9]方面的突破性进展首次揭示了常温型泉古菌(mesophilic crenarchaeota)中的一个功能类群——氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA), 为人们认识常温型古菌的生态功能供了新的视野. AOA 与氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)的功能类似, 即可将 NH_3 氧化成 NO_2^- , 并利用此反应中产生的化学能. AOA 的室内生理^[9]和野外生态学^[10]的实验证实了 AOA 的氨氧化功能. 由于常温型泉古菌是生态系统中的一个极为重要的组成部分, 在数量上远远高于自然环境中的 AOB^[11]. 因此, AOA 在生态系统的物质和能量循环中占据了重要地位. 这种新类型的氨氧化微生物的“出现”, 使得我们必须重新审视常温型古菌对生物地球化学循环的贡献

2008-05-07 收稿, 2008-10-14 收修改稿

^{*} 国家自然科学基金(批准号: 40632013)、国家重点基础研究发展计划项目(批准号: 2007CB815904)和国家海洋公益项目(批准号: 200805068)资助项目

^{**} 通信作者, E-mail: jiao@xmu.edu.cn

及其在生态系统中扮演的角色。

本文结合作者的工作, 总结归纳了迄今与 AOA 相关的研究报道, 从分布、遗传多样性等方面分析并论述了 AOA 在生态系统中的作用及今后研究的发展趋势。

1 氨氧化生物简介

1.1 细菌氨氧化作用

硝化作用是氮循环的一个重要环节, 其反应过程分为 NH_3 到 NO_2^- (氨氧化) 和 NO_2^- 到 NO_3^- (亚硝酸氧化) 两步氧化过程(图 1)。这两步反应分别由不同的功能细菌类群完成: 氨氧化类细菌和硝化细菌

(nitrite-oxidizing bacteria, NOB)^[12]。由于氨氧化是一个限速反应的过程, 因此备受关注。氨氧化类细菌可以分为 3 类: (1) AOB^[13], 一类在好氧条件下将 NH_3 氧化为 NO_2^- 的化能自养型细菌; (2) 厌氧氨氧化细菌 (anaerobic ammonium oxidation bacteria, anammox)^[14], 其在厌氧条件下获取 NO_2^- 的电子来氧化 NH_3 , 从而生成 N_2 。但通常将其归为反硝化过程; (3) 除此之外, 自然界中还是一些可进行异养硝化的细菌^[15]。基因组学方面的最新研究结果为我们认识氨氧化的进化历史提供了初步线索^[16]。

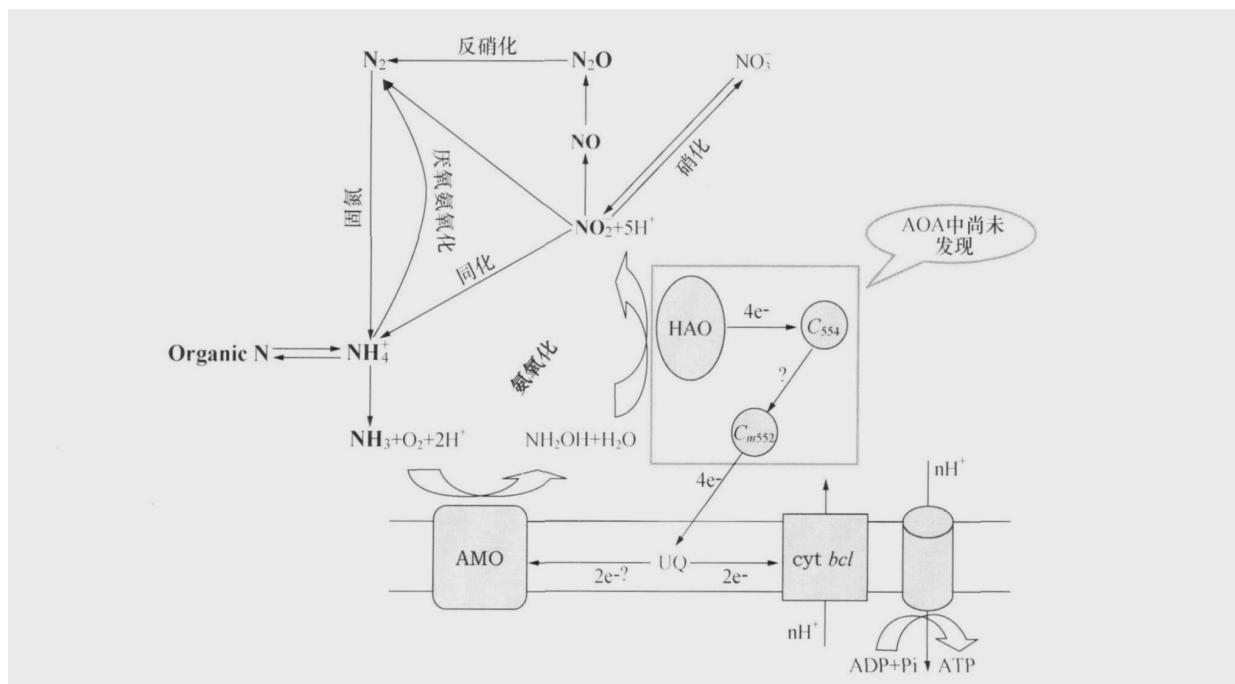


图 1 氮循环基本路径及 AOB 的氨氧化基本机理 (根据文献 [12] 修改)

AMO, 氨单加氧酶; HAO, 羟胺氧化还原酶; C₅₅₄、C₅₅₂、cyt, 细胞色素; UQ, 辅酶 Q。图中的灰色方框表示 *C. symbiosum* 基因组中缺少的关键酶

在 AOA 发现之前, 通常认为 AOB 是氨氧化作用的主要执行者。因此对其研究已经比较详尽细致^[13, 16-21]。目前已知的 AOB 主要属于变形菌纲的和亚纲^[19], 系统发育比较单一。AOB 在自然界分布广泛, 土壤、淡水湖泊、海洋、沉积物以及废水处理等多种环境中均有 AOB 的研究报道^[17]。由于 NH_3 是 AOB 的唯一能量来源, 因此其能量利用效率偏低, 生长缓慢, 难以分离培养^[12]。AOB

的氨氧化功能主要由两个关键酶控制——氨单加氧酶 (ammonia monooxygenase, AMO) 和羟胺氧化还原酶 (hydroxylamine oxidoreductase, HAO)。前者催化 NH_3 至羟胺 (NH_2OH)；后者将 NH_2OH 氧化为 NO_2^- (图 1)^[13]。其中, AMO 是由 *amoA*, *amoB*, *amoC* 基因分别编码的, 三个亚基组成的三聚体膜结合蛋白, 它与甲烷单加氧酶 (particulate methane monooxygenase, pMMO) 同源, 同属于单

加氧蛋白家族^[22]。由于编码亚基的 *amoA* 基因具有较强的保守性,在氨氧化细菌遗传多样性分析方面有一定的优势,所以常被作为研究 AOB 的分子标记^[17, 19]。AOA 的研究也正是应用 *amoA* 基因为分子标记而逐步开展起来的。

1.2 古菌氨氧化作用

新近研究表明,氨氧化作用并非只由上述的细菌类群完成。以往对微生物的功能鉴定主要依赖于纯菌的生理代谢研究,这极大地限制了对“不可培养”微生物的生态功能的了解。然而,从1996年开始,随着环境基因组测序工作的开展,为我们探索未知的功能类群提供了重要的技术支持。2004年,Venter等^[8]在马尾藻海的环境基因组中首次发

现了古菌 *amo* 基因的同系物。与此同时,挪威 Bergen 大学的 Schleper 研究小组在土壤环境基因组中也有类似的发现^[23]。这两个实验揭示了古菌中同样存在可进行氨氧化的功能类群。不过,仅从基因序列信息还不能完全断定古菌是否可以进行氨氧化反应。近期,第一株 AOA——*Nitrosopumilus maritimus* 的成功培养^[9]以及古菌 *amoA* 基因的 mRNA 对氨盐添加的响应^[10],强有力地证明了 AOA 在自然界中的真实存在。到目前为止,富集培养的 AOA 已有4种(表1,图4),其中 *N. maritimes* [http://genome.jgrip-sf.org/draft_microbes/nitma/nitma.info.html] 和 *Cenarchaeum symbiosum*^[24] 的基因组测序工作已经完成。

表1 AOA 培养种的基本信息

菌名	原采地	Archaeal 16S 进化枝	Archaeal <i>amoA</i> 进化枝	<i>amo</i> 基因簇	形态特征	基因组大小	参考文献
<i>Nitrosopumilus maritimus</i>	水族馆	group 1.1a	水体/沉积物分支	<i>amoA</i> 、 <i>amoB</i> 、 <i>amoC</i>	杆状, 0.5—0.9 μm	1.65 Mb	[9]
<i>Cenarchaeum symbiosum</i>	海绵	group 1.1a	水体/沉积物分支	<i>amoA</i> 、 <i>amoB</i> 、 <i>amoC</i>	杆状, 0.8 μm	2.02 Mb	[24]
<i>Nitrososphaera gargensis</i>	热泉	group 1.1b	土壤分支	<i>amoA</i> 、 <i>amoB</i>	球状, 0.9 ± 0.3 μm	—	[27]
<i>Nitrosocaldus yellowstonii</i>	热泉	HWCG III	热泉分支	<i>amoA</i> 、 <i>amoB</i>	球状或短杆状	—	[28]

注:—代表尚未进行

古菌 AMO 和细菌 AMO/PMO 在氨基酸水平上,尤其是在酶的关键位点上具有较强的保守性^[10, 11]。它们的跨膜结构也很相似^[25]。这表明它们在蛋白功能上相近,同属于单加氧蛋白家族。系统发育分析显示,两者的 *amoA* 基因在进化树上分歧成不同的分支^[11],说明它们虽然可能起源于同一祖先,但在地球早期就已经分支进化了^[11]。另一方面,Klotz等^[20]通过基因组分析发现,古菌的氨氧化功能在进化时间上要晚于 AOB,可能是通过基因水平转移(horizontal gene transfer, HGT)获得了细菌的 *amo* 基因而不是种间同源进化的结果。

AOA 和 AOB 在 *amo* 基因簇的装配上也有所不同。通常, AOB 的 AMO 编码基因的操纵元是比较保守的 *C*, *A*, *B* 基因簇排列^[11, 26],而古菌的 AMO 基因簇中不仅存在一些未知功能的插入片段^[11],且在基因簇的组装上也更为多样。研究发现,一些类群的 AOA (group 1.1b 类群 Fosmid 54d9、嗜热的 AOA 株系 *N. gargensis* 和 *N. yellowstonii* 以及深

海类群的 AOA)可能不具有亚基(表1)^[10, 27—29]。这种“缺失”是否会导致 AOA 类群之内在氨氧化机制上的差别还需要进一步的深入研究。最近, Hallam 等^[24]发现 *C. symbiosum* 基因组中缺少 HAO (AOB 氨氧化过程中的第二步关键酶)以及 *C₅₅₄*, *C_{M552}* 等细胞色素的编码基因(图1)。这是迄今为止 AOA 与 AOB 在氨氧化机制上的最大差异。

2 氨氧化古菌分子生态学的研究现状

2.1 氨氧化古菌分子生态学的研究方法

目前,仅依靠单纯的分离培养或生物地化手段去研究 AOA 依然困难重重,因此分子生物学技术是现阶段的主要研究手段(图2)。由于缺少足够的纯系 AOA 的信息,难以应用 16S rRNA 基因去研究 AOA。目前, *amoA* 基因被广泛应用于环境 AOA 的遗传多样性研究(图2)^[30, 31]。然而,现在使用的通用引物是基于极少数环境基因组中古菌 *amoA* 基因序列去设计的^[30],这可能囊括不了所有

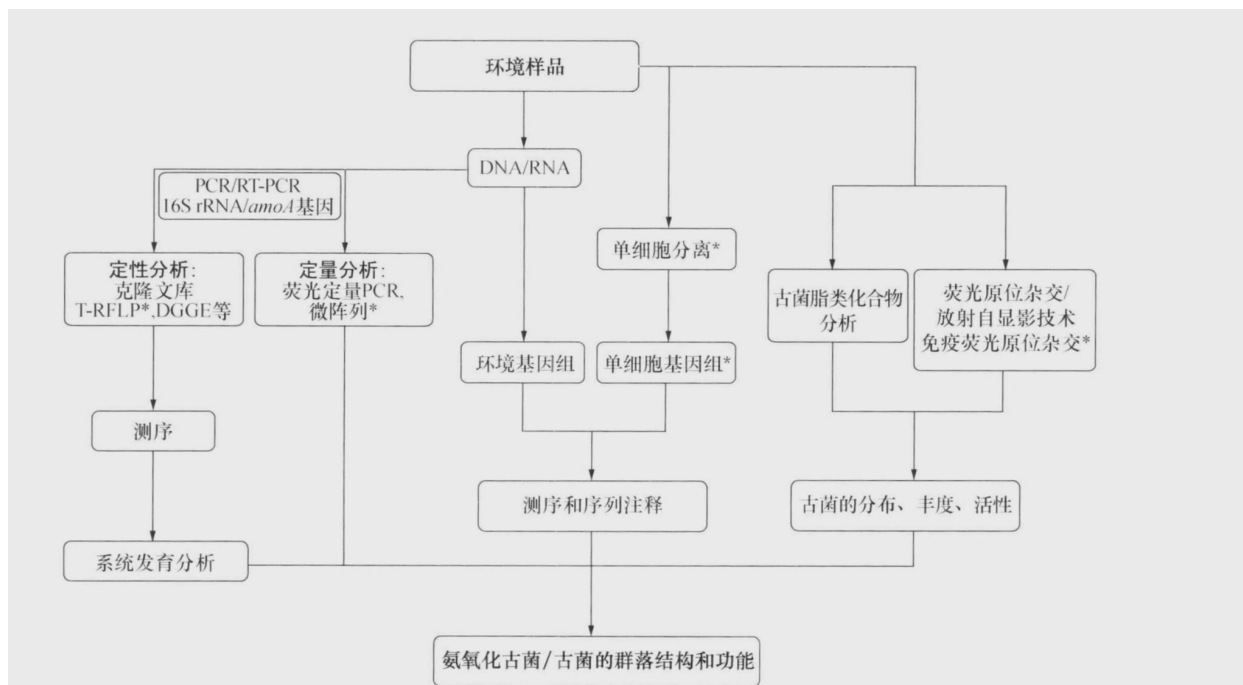


图 2 氨氧化古菌的分子生态学研究方法

* 表示该方法目前尚未应用于 AOA 的研究

AOA 的序列。所以，获取更多 AOA 的全基因组序列或环境基因组大片段序列去重新设计通用引物或匹配单个 AOA 类群的引物是当务之急。这样可能会发现更多差异明显的 AOA 序列，促进人们对这一领域的认识和理解。

荧光定量 PCR 技术 (Real-time PCR) 是当前调查环境 AOA 丰度的主要工具^[29, 31, 32]。它的优点在于不仅可对不同的基因 (古菌的 16S 和 *amoA* 基因) 进行比较^[29, 31]；还可从 DNA 和 RNA 水平上去比较自然生境中 AOB 和 AOA 的量级和代谢活性^[32]。此外，荧光定量 PCR 技术还可以与其他技术相结合进行综合比较^[32]。但这项技术同样也存在一些缺点，例如只能从基因层面上间接反映 AOA 的丰度。这可能会导致一些偏差 (因为 *amoA* 基因在细胞内拷贝数可能并不一定)。我们最终评估 AOA 对生态系统贡献，仍需要对 AOA 进行细胞水平上的定量。免疫原位杂交^[18]是计数环境 AOB 的主要技术之一，也许可以部分解决这个难题。而荧光原位杂交 (FISH) 技术在定量低拷贝功能基因技术方面的突破则为我们提供了新的研究平台^[33]。与上述技术手段相比，微阵列技术具有快速、简便、信息量大等优点，

已经被广泛应用于环境微生物生态研究。最近，Ward 等^[34]应用微阵列技术对美国东海岸两个河口区域的 AOB 群落结构进行了比较分析。相信 AOA 的微阵列不久之后将有重要应用。

值得注意的是，目前环境微生物生态学的研究越来越注重多学科、多种技术手段相结合^[32, 35, 36]。由此可见，在今后的环境 AOA 调查中，多学科交叉结合是必然的趋势。稳定同位素探测技术将是其中最具前景的技术之一^[37]。

2.2 氨氧化古菌分子生态学的研究进展

AOA 的发现打破了 AOB 在氨氧化过程中“一枝独秀”的格局^[11, 38]，迅速成为了环境微生物生态学功能类群方面的研究热点之一。目前，国际上主要针对 AOA 的生态分布、遗传多样性、丰度、与环境因子的联系，以及生态功能等方面开展了一系列研究。

2.2.1 AOA 的生态分布和丰度 2005 年，美国斯坦福大学的 Francis 等^[30]率先用古菌 *amoA* 基因的特异引物对土壤、沉积物、黑海低氧水体以及大洋真光层等环境样品进行了 PCR 扩增。实验结果表

明, AOA 在这些自然环境中普遍存在^[30]. 随后, AOA 在低氧废水处理器^[39]、低溶氧高硫化氢特征的黑海“分层带”^[35, 40]、河口沉积物^[41]、深海沉积物^[42]、土壤^[32, 43]、海洋动物组织^[44, 45]、陆地热泉口^[27, 28, 46, 47]以及矿区^[48, 49]等环境中踪迹也一一被发现. 作者最近对厦门东山岛海水养殖区水体中的古菌群落结构调查也发现了 AOA (图 3). 这些调查极大地拓展了我们对 AOA 生态分布的了解. 近日, 又有两株嗜热类型 AOA *N. gargensis*^[27] 和 *N. yellowstonii*^[28] (表 1) 被富集培养, 不仅从细胞水平上提供了嗜热 AOA 的证据, 更为进一步研究氨氧化古菌的进化历史提供了重要材料.

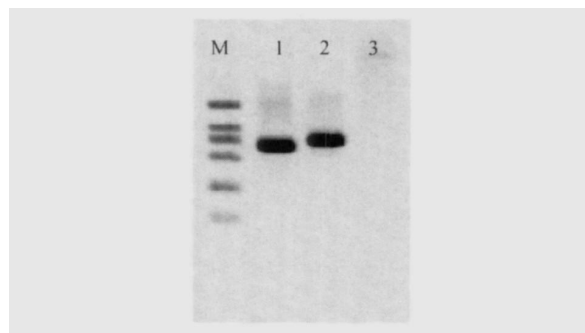


图3 东山岛海水养殖区表层水样的古菌 *amoA* 基因扩增产物

1, DL-2000 DNA 标志; 1 和 2, 不同养殖池古菌 *amoA* 基因 PCR 结果; 3, 阴性对照

AOA 不仅在自然环境中分布广泛, 并且数量上也超过了 AOB. Wuchter 等^[31] 和 Mincer 等^[29] 的研究结果表明, 在海洋中, 古菌 *amoA* 基因的拷贝数要高出细菌 *amoA* 基因 1 至 3 个数量级. 而在土壤环境中, 古菌 *amoA* 基因数量最高可达 AOB 的 3000 倍^[32], 并且在 mRNA 水平上也远远超过了 AOB^[10, 32]. 虽然 AOB 可能在某些特定环境中会处于优势^[35, 50], 总体上 AOA 才是地球上的最丰富的氨氧化生物^[11, 29, 31, 32, 42, 51]. 此外, 一些学者还发现, 古菌 *amoA* 基因与常温型泉古菌的 16S rRNA 基因、细胞数量以及脂类标志物之间具有较好的正相关关系. 这说明绝大部分的常温型泉古菌可能都是 AOA^[29, 31, 32, 36]. 如果这个推测正确, 那么自然界中总共有 2.3×10^{28} 个常温型泉古菌^[11] 可以进行氨氧化. 据 Ingalls 等的估算, 仅在海洋生态系统中, 海洋泉古菌可以每年生成 1.2 Gt/a 的 NO_2^- ,

与全球海洋的新生产力相当^[52]. 如果根据 Redfield 比率换算, AOA 氧化海洋中的 NH_3 获能固定的 CO_2 则可达到 0.275 Gt · C/a, 远远超过了每年沉降到海洋沉积物中的碳量 (0.15 Gt · C/a)^[31, 52].

2.2.2 AOA 与环境因子之间的联系 总体上, AOB 可分为 4 个生态类群: (1) 淡水沉积物类群, (2) 污水类群, (3) 土壤类群, (4) 海洋类群^[13, 21]. 这 4 大类群具有各自独特的环境适应机制^[21]. AOA 与 AOB 的生态功能相似, 那么 AOA 是否也同样有类似的生态类群和环境适应机制呢? 从古菌 *amoA* 基因系统发育树 (图 4) 可以发现, AOA 总体上分为了水体/沉积物 (water column sediment group) 和土壤 (soil group) 两大进化分支. 说明 AOA 可能通过环境调控和自然选择进化形成了不同的生态类群^[30]. 在某些“特殊”环境下, 如低氧废水处理器和海绵组织, AOA 系统发育比较单一^[39, 45], 是 AOA 适应“特殊”生境的最好例证. 然而, 我们对影响 AOA 分布的具体环境因素还知之甚少. 近期研究发现, 在海洋生态系统中, 营养盐、浮游植物的生物量和群落结构是调控 AOA 的环境因子^[36]. 这与 Murray 等^[53, 54] 早年的调查结果一致. 而盐度则是控制河口 AOA 群落结构的重要环境因子^[50], 且与硫化物一起控制着河口沉积物中的氨氧化速率^[55]. 在土壤生境中, pH 是影响古菌 *amoA* 基因拷贝数的环境因子^[43]. 土壤 AOB 以其独特的尿素代谢功能来适应 pH 的影响^[21], AOA 是否也同样具有类似的生态适应机制? 这还有待于进一步的研究. 学者们还发现, 温度也是一项重要的环境指标, 可能会影响 AOA 遗传多样性和种群结构^[56]. 以上的研究实例不仅揭示了环境因素对 AOA 的生态分布、数量、遗传多样性的调控作用, 而且为进一步理解 AOA 的环境适应机制提供了重要线索.

AOA 作为生态系统中一个环节, 必然与其他生物之间存在着相互作用. 对 AOB 的研究表明, AOB 与 NOB 通过 NO_2^- 的介导, 可以互利“共生”^[12, 13, 21]. 近期, Mincer 等^[29] 发现 AOA 与 NOB 同样存在着类似的“共生”关系. 同样由于 NO_2^- 的介导, AOA 与 anammox 细菌之间也存在着耦联^[35, 40]. Lam 等^[35] 发现 AOA 和 α -AOB 分别占据了黑海的低氧水层 (lower oxic zone) 和缺氧水层

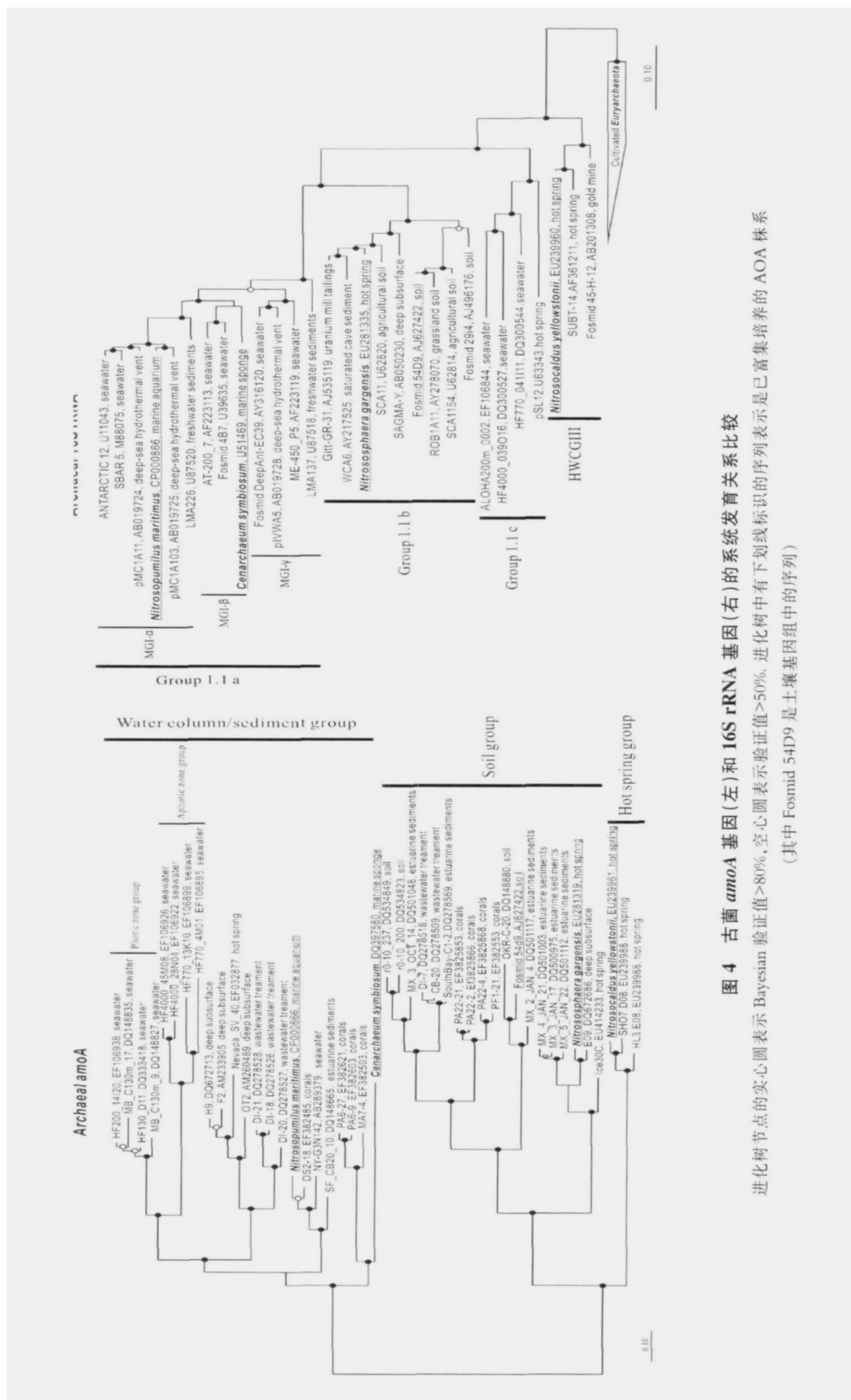


图 4 古菌 *amoA* 基因(左)和 16S rRNA 基因(右)的系统发育关系比较

进化树节点的实心圆表示 Bayesian 验证值>80%,空心圆表示验证值>50%。进化树中有下划线标识的序列表示是已富集培养的 AOA 株系(其中 Fosmid 54D9 是土壤基因组中的序列)

(suboxic zone), 从而直接或间接的为缺氧水层中的 anammox 细菌提供 NO_2^- . 由于 anammox 细菌是海洋氮流失的重要源头^[57], 因此 AOA 与 anammox 细菌的耦联作用意义重大.

2.2.3 AOA 的系统发育 对常温型泉古菌 16S rRNA 基因生态研究发现, group 1. 1a 类群主要分布于海洋环境; 而 group 1. 1b 和 group 1. 1c 类群则占据了陆源环境(图 4)^[58, 59]. 这与古菌 *amoA* 基因的两大生态型相对应(图 4)^[30, 41], 而新近发现的热泉分支的嗜热 AOA *N. yellowstonii* 则与 16S 进化树上的 HWCIII 类群相对应^[26](图 4).

相对而言, 海洋浮游古菌的 *amoA* 基因系统发育较为单一, 在系统进化树上主要分为有光层(Photic zone group)和无光层(Aphotic zone group)两个进化分枝(图 4)(为了全面的认识 AOA 的系统发育关系我们应用 ARB 软件构建了大于 1200 条的古菌 *amoA* 基因的进化树, 本文展示了部分示意图). 这种分化可能是由光抑制导致的^[29]. 早在 2000 年, Massana 等就已经发现海洋泉古菌的 16S rRNA 基因趋向于不同水层的“生态位”分化^[58]. 因此, 两者(海洋泉古菌的 16S rRNA 和 *amoA* 基因)之间可能也一一对应——MGF 对应 *amoA* 真光层类群, MGF 对应 *amoA* 无光层类群(图 4). 作者在中国南海同样发现了海洋泉古菌在深度剖面上的分化, 并且我们的数据还显示 MGF 类群可能也与 *amoA* 真光层类群对应. 可见, 这种水层分化在大洋中是普遍存在的, 但具体的分化原因和分化水层尚不清楚. 另一方面, AOA 的 16S rRNA 和 *amoA* 基因系统发生树之间也可能只是较为相似但并不一一对应. 这种现象在 AOB 研究中早有报道^[18]. 例如 *N. maritimus* 在 16S rRNA 和 *amoA* 基因在系统发生树上的位置就不对应(图 4). 此外, Mincer 等^[29]发现 group 1. 1c 类群可能也参与了氨氧化过程(图 4), 但还没有与之相对应的 *amoA* 序列. 这部分工作需要更多的纯系菌株的信息支持.

2.2.4 AOA 的生理代谢机制 目前, 人们对 AOA 生理代谢机制的了解尚依赖于一些有限的菌株生理实验数据以及 *C. symbiosum* 的基因组信息. 对 *C. symbiosum* 的基因组研究发现, 它具有两种迥异的固碳机制: 3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环^[25, 60]和

氧化型三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)^[25], 说明其可以进行自养代谢, 也可以通过混合营养方式生活. 这和之前的野外生态学研究结果一致, 即常温型泉古菌可以利用 CO_2 , 也可以吸收有机碳源^[61, 62]. 那么 AOA 在什么环境中会营自养生活, 又在什么情况下营混合营养生活? 在此, 借鉴 -AOB *Nitrosomonas europaea* 的研究实例来思考这个问题. *N. europaea* 是一株特殊的 AOB, 和其他的化能自养型 AOB 不同的是, 它可以吸收有机碳源. 然而, *N. europaea* 并不利用这些有机碳获能, NH_3 仍然是它的唯一能源. 学者们称这种代谢方式为化能无机异养型代谢(chemolithoheterotrophy). 我们注意到, 虽然目前的基因组方面的研究成果不能排除 NH_3 以外的能量来源^[24], 但现有生理实验显示, *N. maritimus*, *N. gargensis* 和 *N. yellowstonii* 都进行化能自养代谢^[9, 27, 28]. 所以, AOA 的氧化型 TCA 固碳途径可能也是化能无机异养型生存策略的产物. 现有的数据表明, 在活性碳源缺乏的大洋深处, 海洋泉古菌都是自养生物^[52], 而氨氧化作用是它们的主要能量来源^[51]. 此外, 基因组研究还发现 AOA 同样可以释放 N_2O ^[24], 其可能与 AOB、反硝化细菌和 anammox 细菌一起在全球变暖过程中的起着不可忽视的作用^[38].

3 展望

近 30 年来, 分子生物学技术的应用极大地推动了环境微生物生态学的发展. 尤其是近年来兴起的环境基因组学, 对揭示“不可培养”微生物的功能揭示做出了重大贡献, 正如它在变形菌视紫质(proteorhodopsin)发现中起到的关键作用^[63, 64], 其对 AOA 的发现同样功不可没. 然而, 分子生物学手段并不能为我们解决所有 AOA 的生态学问题. 这就要求我们运用新的技术方法, 结合其他学科重点攻关以下几方面:

(1) 纯系 AOA 菌株的分离. 纯系菌株的分离培养一直是常温型泉古菌研究方向的难点. 这可能是因为 AOA 与 AOB 相类似——能量利用效率低导致生长缓慢, 与异养细菌竞争中处于劣势地位而导致的^[21]. *C. symbiosum*^[24]和 *N. maritimus* 的全基因组序列的破译 [http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/nitma/nitma.info.html] 不仅为我们研究

AOA 的生理代谢机制提供了第一手资料, 也为我们设计合适的培养基和培养策略提供了重要的技术支持. 此外, 单细胞基因组学方法^[65] (单细胞分离手段 (FISH 技术或免疫原位杂交技术与流式细胞分选技术的结合) 与基因组测序的结合) 可以快速筛选、鉴定自然生态样品中 AOA, 为避开培养过程中种种困难提供了重要选择 (图 2), 也为研究者分离 AOA 菌株提供了又一新思路.

(2) AOA 的氨氧化机理. NH_2OH 对氨氧化生物具有重要意义. 一方面, 它对细胞有毒害作用; 另一方面, 它也是氨氧化过程中的重要能源^[21]. AOA 可能缺少代谢 NH_2OH 的酶^[24] (图 1), 那它是如何利用 NH_2OH ? 这是今后研究需要回答的一个关键问题. 此外, 考虑到不同类群 AOA 的 AMO 基因簇在组装上也不一样, 考察 AOA 类群之间在 *amo* 基因调控机制上的差异也是重要研究方向之一.

(3) AOA 的原位氨氧化速率. 虽然 AOA 可能是地球上最丰富的氨氧化微生物类群^[11, 38], 但只有对 AOA 和 AOB 的原位氨氧化速率进行比较之后, 才能最终评定两者对氮循环的贡献. 在海洋真光层区域, 氨氧化古菌产生的“再生”N 对海洋生态系统同样非常重要. Yool 等^[66]发现, 仅真光层内硝化再生的 N 就可达到海洋初级生产力 10%—25%. 这项研究极大地冲击了建立在“真光层无硝化作用”假设基础之上的新生产力概念. 因此, 测定 AOA 的原位氨氧化速率对于重新评估硝化“再生 N”在海洋初级生产力功能结构的贡献^[67]意义重大. 要获得这方面的数据, 首先必须区分细菌和古菌的氨氧化作用. 虽然应用 AMO 的阻断剂测量 AOB 的氨氧化速率的技术已经比较成熟^[68], 但由于 AOA 和 AOB 的 AMO 的结构相似^[11, 25, 27], AMO 阻断剂并不是最佳选择. 而 HAO 酶以及后续的电子传递链或许是一种可行的方案. 这需要对 AOA 的氨氧化机制完全解析才可以针对性的开发区分 AOB 和 AOA 的新型阻断剂.

(4) AOA 的原位生态功能. 目前, 环境微生物生态学的主要技术手段已经从单纯的室内培养发展到目前的环境基因组学、比较基因组学、环境蛋白组学、转录组学等新兴组学方法. 然而对微生物在生态系统中的功能和作用, 最终还需要从原位生态

功能的角度上去探讨, 这将有助于我们更深刻的理解全球的生物地球化学循环过程^[69]. 因此, 尚有待于结合新技术、新方法去进一步研究.

总之, AOA 研究是环境微生物生态学研究的一个新领域. AOA 的深入研究将使我们全球生态系统能流、物质循环的过程机制产生新的认识、对学科发展也将起到推动作用, 并会为环境微生物资源开发利用作出贡献.

致谢 感谢张传伦教授、曾永辉和舒青龙博士在论文写作过程中给予的宝贵意见.

参 考 文 献

- 1 Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *PNAS*, 1977, 74(11): 5088—5090
- 2 Barns SM, Delwiche CF, Palmer JD, et al. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *PNAS*, 1996, 93(17): 9188—9193
- 3 Woese CR, Magrum LJ, Fox GE. Archaeobacteria. *J Mol Evol*, 1978, 11(3): 245—252
- 4 Delong EF. Archaea in coastal marine environment. *PNAS*, 1992, 89(12): 5685—5689
- 5 Fuhrman JA, McCallum K, Davis AA. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature*, 1992, 356(6365): 148—149
- 6 Karner MB, DeLong EF, Karl DM. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, 2001, 409(6819): 507—510
- 7 Chaban B, Ng SYM, Jarrell KF. Archaeal habitats—from the extreme to the ordinary. *Can J Microbiol*, 2006, 52(2): 73—116
- 8 Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 2004, 304(5667): 66—74
- 9 Könneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, et al. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 2005, 437(7058): 543—546
- 10 Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, et al. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol*, 2005, 7(12): 1985—1995
- 11 Nicol GW, Schleper C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: Important players in the nitrogen cycle? *Trends Microbiol*, 2006, 14(5): 207—212
- 12 Werner D, Newton WE. Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment. 1st ed, Netherlands:

- Springer, 2005, 255—276
- 13 Kowalchuk GA, Stephen JR. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55: 485—529
 - 14 Mulder A, van de Graaf AA, Robertson LA, et al. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol*, 1995, 16(3): 177—184
 - 15 Hayatsu M, Tago K, Saito M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Sci Plant Nutr*, 2008, 54(1): 33—45
 - 16 Klotz MG, Stein L Y. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiol Lett*, 2008, 278(2): 146—156
 - 17 Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(12): 4704—4712
 - 18 Bothe H, Jost G, Schlöter M, et al. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, 24(5): 673—690
 - 19 Purkhold U, Pommerening-Roser A, Juretschko S, et al. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: Implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(12): 5368—5382
 - 20 Klotz MG, Arp DJ, Chain PSG, et al. Complete genome sequence of the marine, chemolithoautotrophic, ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosococcus oceanus* ATCC 19707. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 6299—6315
 - 21 Arp DJ, Chain PSG, Klotz MG. The impact of genome analyses on our understanding of ammonia-oxidizing bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2007, 61: 503—528
 - 22 Holmes AJ, Costello A, Lidstrom ME, et al. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, 132(3): 203—208
 - 23 Schleper C, Jurgens G, Jönascheit M. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(6): 479—488
 - 24 Hallam SJ, Konstantinidis KT, Putnam N, et al. Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *PNAS*, 2006, 103(48): 18296—18301
 - 25 Hallam SJ, Mincer TJ, Schleper C, et al. Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biol*, 2006, 4(e95)
 - 26 Norton JM, Alzerreca JJ, Suwa Y, et al. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Arch Microbiol*, 2002, 177(2): 139—149
 - 27 Hatzenpichler R, Lebedeva EV, Spieck E, et al. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeota from a hot spring. *PNAS*, 2008, 105(6): 2134—2139
 - 28 de la Torre JR, Walker CB, Ingalls AE, et al. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environ Microbiol*, 2008, 10(3): 810—818
 - 29 Mincer TJ, Church MJ, Taylor LT, et al. Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ Microbiol*, 2007, 9(5): 1162—1175
 - 30 Francis CA, Roberts KJ, Beman JM, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *PNAS*, 2005, 102(41): 14683—14688
 - 31 Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, et al. Archaeal nitrification in the ocean. *PNAS*, 2006, 103(33): 12317—12322
 - 32 Leininger S, Urich T, Schlöter M, et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, 2006, 442(7104): 806—809
 - 33 Smolina I, Lee C, Frank-Kamenetskii M. Detection of low-copy-number genomic DNA sequences in individual bacterial cells by using peptide nucleic acid-assisted rolling-circle amplification and fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(7): 2324—2328
 - 34 Ward BB, Eveillard D, Kirshtein JD, et al. Ammonia-oxidizing bacterial community composition in estuarine and oceanic environments assessed using a functional gene microarray. *Environ Microbiol*, 2007, 9(10): 2522—2538
 - 35 Lam P, Jensen MM, Lavik G, et al. Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *PNAS*, 2007, 104(17): 7104—7109
 - 36 Herfort L, Schouten S, Abbas B, et al. Variations in spatial and temporal distribution of Archaea in the North Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 62(3): 242—257
 - 37 Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, et al. Stable isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 2000, 403(6770): 646—649
 - 38 Francis CA, Beman JM, Kuypers MMM. New processes and players in the nitrogen cycle: The microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME J*, 2007, 1(1): 19—27
 - 39 Park HD, Wells GF, Bae H, et al. Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(8): 5643—5647
 - 40 Coolen MJL, Abbas B, van Bleijswijk J, et al. Putative ammonia-oxidizing Crenarchaeota in suboxic waters of the Black Sea: A basin-wide ecological study using 16S ribosomal and functional genes and membrane lipids. *Environ Microbiol*, 2007, 9(4): 1001—1016

- 41 Beman JM, Francis CA. Diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the sediments of a hypernitrified subtropical estuary: Bahia del Tobari, Mexico. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(12): 7767—7777
- 42 Nakagawa T, Mori K, Kato C, et al. Distribution of cold-adapted ammonia-oxidizing microorganisms in the deep-ocean of the northeastern Japan Sea. *Microb Environ*, 2007, 22(4): 365—372
- 43 He J, Shen J, Zhang L, et al. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environ Microbiol*, 2007, 9(9): 2364—2374
- 44 Beman JM, Roberts KJ, Wegley L, et al. Distribution and diversity of archaeal ammonia monooxygenase genes associated with corals. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 5642—5647
- 45 Steger D, Ettinger-Epstein P, Whalan S, et al. Diversity and mode of transmission of ammonia-oxidizing archaea in marine sponges. *Environ Microbiol*, 2008, 10(4): 1087—1094
- 46 Reigstad LJ, Richter A, Daims H, et al. Nitrification in terrestrial hot springs of Iceland and Kamchatka. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 64(2): 167—174
- 47 Zhang CL, YE Q, Huang ZY, et al. Global occurrence of archaeal *amoA* genes in terrestrial hot springs. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(20): 6417—6426
- 48 Weidler GW, Dornmayr-Pfaffenhuemer M, Gerbl FW, et al. Communities of Archaea and Bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing Crenarchaeota. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(1): 259—270
- 49 Spear JR, Barton HA, Robertson CE, et al. Microbial community biofabrics in a geothermal mine adit. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(19): 6172—6180
- 50 Santoro AE, Francis CA, de Sieyes NR, et al. Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. *Environ Microbiol*, 2008, 10(4): 1068—1079
- 51 Yakimov MM, La Cono V, Denaro R, et al. Primary producing prokaryotic communities of brine, interface and seawater above the halocline of deep anoxic lake L'Atalante, Eastern Mediterranean Sea. *ISME J*, 2007, 1(8): 743—755
- 52 Ingalls AE, Shah SR, Hansman RL, et al. Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *PNAS*, 2006, 103(17): 6442—6447
- 53 Murray AE, Preston CM, Massana R, et al. Seasonal and spatial variability of bacterial and archaeal assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(7): 2585—2595
- 54 Murray AE, Blakis A, Massana R, et al. A time series assessment of planktonic archaeal variability in the Santa Barbara Channel. *Aquat Microb Ecol*, 1999, 20(2): 129—145
- 55 Caffrey JM, Bano N, Kalanetra K, et al. Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J*, 2007, 1(7): 660—662
- 56 Urakawa H, Tajima Y, Numata Y, et al. Low temperature decreases the phylogenetic diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in aquarium biofiltration systems. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(3): 894—900
- 57 Arrigo KR. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*, 2005, 437(7057): 349—355
- 58 Massana R, DeLong EF, Pedros-Alio C. A few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(5): 1777—1787
- 59 Ochsenreiter T, Selezi D, Quaiser A, et al. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ Microbiol*, 2003, 5(9): 787—797
- 60 Berg IA, Kockelkorn D, Buckel W, et al. A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in archaea. *Science*, 2007, 318(5857): 1782—1786
- 61 Ouverney CC, Fuhrman JA. Marine planktonic archaea take up amino acids. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(11): 4829—4833
- 62 Herndl G, Reinthaler T, Teira E, et al. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(5): 2303—2309
- 63 BçãO, Koonin EV, Aravind L, et al. Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy. *Science*, 2000, 289: 1902—1906
- 64 Jiao NZ, Feng FY, Wei B. Proteorhodopsin: A new path for biological utilization of light energy in the sea. *Chinese Sci Bull*, 2006, 51(8): 889—896
- 65 Walker A, Parkhill J. Single-cell genomics. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(3): 176—177
- 66 Yool A, Martin AP, Fernandez C, et al. The significance of nitrification for oceanic new production. *Nature*, 2007, 447(7147): 999—1002
- 67 焦念志, 王 荣. 海洋初级生产力的结构. *海洋与湖沼*, 1993, 24(4): 340—344
- 68 Ward BB, O'Mullan GD. Community level analysis: Genetic and biogeochemical approaches to investigate community composition and function in aerobic ammonia oxidation. *Methods Enzymol*, 2005, 397: 395—413
- 69 Azam F, Malfatti F. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5(10): 782—791